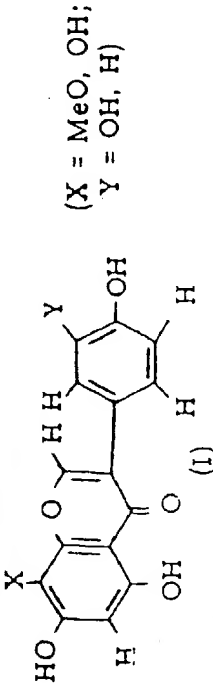


# DERWENT PUBLICATIONS LTD.

27437

27437A/15	R02 D16	MICR-19.06.74 *J5 0160-483	R(6-A1) D(5-C).1	77
MICROBIOCHEMICAL RE 19.06.74 JA-069119 (25 12.75) A23k A61k C12d				
Physiologically active iso-flavone prodn. - by aerobically culturing Aspergillus on potato starch, glucose, soybean medium				
Isoflavones (I)				
 <p>(X = MeO, OH; Y = OH, H)</p>				
are produced by an aerobic culture of fungi; 3',4',5,7-tetrahydroxy-8-methoxyisoflavone (II), psi-tectorigenin (III, X = OMe, Y = H), and 8-hydroxygenistein (IV, X = OH, Y = H) are produced by Aspergillus.				
USE L-Dopa decarboxylase inhibitor.				
EXAMPLE A. niger NRRL 3122 was cultured with shaking at 27°C for 5 days on a medium (pH 6.0) contg. potato starch 2 glucose				
27437A			J50160483	

1, soybean meal, 2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1, and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%; the pH changed to 5.6, 3.6, 3.2, 5.0 and 6.2 after 1, 2, 3, 4, and 5 days of the cultivation. The culture filtrate (9 l.) was extd 3 times with 4.5 l. BuOAc at pH 2.0. The cells (1.2 kg) are also extd. with 5 l. MeOH and concd. to dryness. The active substances were extd. with 1 l. water (pH 8.0) and then with 0.5 l. BuOAc 3 times at pH 2.0 and combined with the above extract of the culture filtrate. The combined extract was concd. to dryness yielding 12.3 g tar substance. It was subjected to silica gel chromatography eluting with  $\text{CHCl}_3$ -Me MeOH (50:1) to separate (III), genistein (V), (II), orobole (VI) and (IV). Each fraction was dried, subjected to "Sephadex LH-20" (RTM) silica gel chromatography and crystd. from MeOH- $\text{C}_6\text{H}_6$ . Yields were 15.8, 4.8, 80.3, 0.1, and 4 mg for (II), (III), (V), (VI) and (IV). They were sol. in alkaline water, MeOH, EtOH, BuOH,  $\text{Me}_2\text{CO}$ , DMSO and hardly sol. in  $\text{C}_6\text{H}_6$ ,  $\text{CHCl}_3$  and toluene.  $\text{ID}_{50}$  against  $\beta$ -3,4-dihydroxy-phenyl-L-alanine decarboxylase were 0.2, 51.0, and 2.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for (II), (III) and (IV). (14pp-).



特許庁  
(20607)

特

許

願

第 2 号  
(特許法第20条第1項第2号)  
(の発明による特許出願)  
昭和49年6月19日

特許庁長官宛

1. 発明の名称 生理活性を有するイソフラボン  
ン化合物の微生物による製造法
2. 特許請求の範囲に記載された発明の数・・・4

3. 発明者

住所 東京都港区麻生北4丁目23番地

氏名 海 峯 英 夫 外2名

4. 特許出願人

住所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号

名称 財団法人微生物化学研究会

代表者 市 川 繁 二

5. 代理人

住所 〒105 東京都港区西新橋1丁目2番9号

三井物産館内 電話(561)0261

(2400) 氏名

金 丸 義 男

10 969119

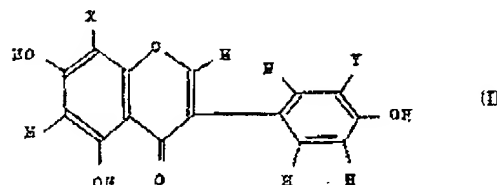
明 細 書

1. 発明の名称

生理活性を有するイソフラボン化合物の  
微生物による製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 米状菌に属する次の一般式



(式中、Xはメトキシ基でXはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でXは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でXは水素原子である)のイソフラボン化合物の生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することを特徴とする、微生物による上記一般式(I)のイソフラボン化合物の製造法。

⑬ 日本国特許庁

## 公開特許公報

⑪特開昭 50-160483

⑫公開日 昭50.(1975) 12.25

⑬特願昭 49-69119

⑭出願日 昭49.(1974) 6.19

審査請求 未請求 (全14頁)

庁内整理番号

7110 49

6617 44

7169 44

⑮日本分類

36(2)D521

30 A32

16 E41

⑯Int. Cl<sup>2</sup>

C12D 13/00

A61K 37/64

A61K 31/35

A23K 1/16

(2) アスベルギルス菌に属する3',4',5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、3',4',5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボンの製造法。

(3) アスベルギルス菌に属するプサイ・テクトリゲニン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、プサイ・テクトリゲニンの製造法。

(4) アスベルギルス菌に属する8-ヒドロキシゲニスチン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、8-ヒドロキシゲニスチンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は微生物を用いる醸酵法によりドーパ脱炭酸酵素系に対して阻害作用をもつ新規物質3',4',5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン、あるいは公知物質4',5,7-トリヒドロキシ

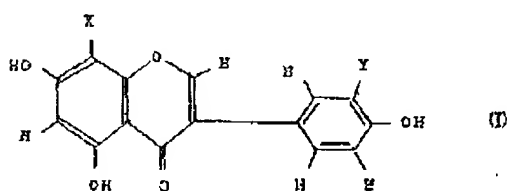
シ-8-メトキシイソフラボン(すなわちプサイ・テクトリゲニン(pai-tectorigenin))又は4',6,7,8-テトラヒドロキシイソフラボン(すなわち8-ヒドロキシグニスチン(8-hydroxygnisticin))を製造する方法に関する。

本発明者は人の高血圧症及びパー・キンソン氏病のドーパでの治療における経済費の削減を目的として、微生物の培養液中にアロマトキシクアミノ酸類のカルボキシル基を脱炭酸するドーパ脱炭酸酵素(以下D.D.Oと略記する)の作用を阻害する物質を系統的に探査し、該状態の培養液及び菌体中にD.D.O阻害物質が各種存在することをみだし、これらを単離精製し化合物を究めイソフラボン骨格を持つ3種の化合物である事を見出した。さらに化学的な詳細な研究から、これら化合物の一つは新規化合物である3',4',6,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボンである事を明かにするとともに他の二つの化合物が4',6,7-トリヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン及び4',6,7,8-テトラヒドロキシイソフラボン

3

ン基でY=水素原子である場合の化合物が8-ヒドロキシグニスチン(以下では化合物(II)ともいう)である。

それ故、本発明の要旨とするところは、該状態に属する次の一般式、



(式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である)のイソフラボン化合物の生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することを特徴とする、微生物による上記一般式(II)のイソフラボン化合物の製造法にある。

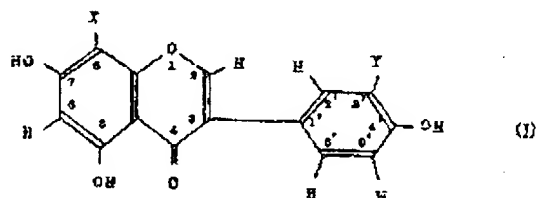
本発明以降においては、別記化合物(III)は天然物

4

特開 1350-160483(2)

ンであることを特定した。またこれら3種の化合物を微生物の培養物から採取する方法を説明した。

上記の3つのイソフラボン化合物は次の一般式



(式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である)で表わされるが、一般式(I)においてX=メトキシ基及びY=ヒドロキシ基である場合の化合物が新規物質3',4',6,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン(以下では化合物(II)ともいう)であり、X=メトキシ基及びY=水素原子である場合の化合物がプサイ・テクトリゲニン(以下では化合物(III)ともいう)であり、さらにX=ヒドロキ

4

としても化学合成物としても報告されておらず本発明者が初めて発見した新規物質である。また化合物(III)は、テクトリゲニンの構造異性体として、ウィルソン・ベイカー等(Wilson Baker et al)により1953年初めて合成されChemistry and Industry March 277, 1953, に報告されており、化合物(III)については1960年ブタペスト工科大学のエル・ファルカスとジュー・バラディ(L. Farkas and J. Várady)により合成されActa chimica Academiae Scientiarum Hungaricae 24, 225-230, 1960に報告されているが、いずれの化合物も微生物の培養物より採取したのは本発明者が最初である。さらに本発明者はこれら化合物(I), (II), (III)の各種生物活性に対する阻害作用の研究から、D.D.O阻害活性を有することの他、これら化合物がヒスチジン脱炭酸酵素(以下H.D.Oと略記する)阻害活性、カタコールオームアル脱炭酸酵素(以下COMTと略記する)阻害活性及びエストロゲン活性を有することを見出した。これら阻害阻害活性は本発明者らにより

5

されてある(昭和46年4月28日特許審判請求)。

微生物は人工的に、又自然界においても発酵を起しやすいが本発明にいうアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 はその発酵菌の余てを包括する。本発明に言う菌種はインフラザン化合物(I), (II), (III)を生産し、これらの菌及び変異菌と明確に区別されないものはすべてこれを包括する。

それ故、本発明の第一の実施態様によれば、アスペルギルス菌に属する3,4,5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシインフラザン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、3,4,5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシインフラザンの製造法が提供される。

また、本発明の第二の実施態様によれば、アスペルギルス菌に属するブサイ・テクトリゲニン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、ブサイ・テクトリゲニンの製造法が提供される。

さらに、本発明の第三の実施態様によれば、ア

9

初めて明らかにされ、これ以前には知られていなかった。以上の産業菌活性を有する化合物(I), (II), (III)は、D.D.C及びDDMT活性を起すことから、パーキンソン氏病のドーパでの治療における賦活薬として、ノルアドレナリンの生合成を阻害することにより高血圧症の治療薬、H.D.D.活性を阻害することから、抗アレルギー、抗炎症、の治療薬として、またエストロゲン活性を有する事から避妊及び動物での体質増加、生育促進剤としての用途が与えられる。

本発明の方法で用いる糸状菌に属する一般式(II)の化合物の生産菌の一例としてはアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 (*Aspergillus niger* NRRL 3122)があり、このアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 株は、米国農務省農薬研究局北部利用研究所発菌部(NRRL)に保存された公知の保存菌であつて本発明者らがNRRLより分譲を受けたものである。なお、このアスペルギルス・ニガー NRRL-3122 株は工務技術院微生物工務技術研究所に工務研究第2053号として登録

7

アスペルギルス菌に属する8-ハイドロキシングエムステイン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、8-ハイドロキシングエムステインの製造法が提供される。

本発明の方法を実施するに当つては、使用生産菌を微生物の通常公知の培養法で好氣的に培養して培養物中に目的化合物を生産せしめることができる。また本発明の目的化合物(I), (II), (III)を生産せしめるためにカビ、放線菌その他の微生物の培養に用いられる培養基はすべて利用できる。例えば炭源としてはグルコース、マルトース、デキストリン、澱粉、ラクトース、サツカロース、グリセリンなど、又窒素源としてはペプトン、肉エキス、酵母、酵母エキス、大豆粉、綿実粉、落花生粉、コーンステープリカー、米ぬか、無機窒素化合物などを利用できるが、特に化合物(I), (II), (III)の生産のためには、グルコース、酵母を炭素源とし、大豆粉を窒素源とした培養基、これら化合物の生産のため好ましい培養基である。化合物(I),

(II), (III)を生産せしめるため必要とするならば、炭源、窒素源、重金屬の濃度を加えることもできる。なお培養液中に於けるいれ培養液中に消泡を必要とする時はシリコン樹脂、大豆油、アデカノール等の消泡剤を使用できる。

化合物(I), (II), (III)の生産のための培養温度は20~30℃が好ましく、化合物(I), (II), (III)は好氣的に培養して得られるが、ペニシリン等の抗生物質の生産のために用いられる。却て培養法、通気装置など培養法がそのまま本発明のために用いられる。

化合物(I), (II), (III)の生産菌の一例であるアスペルギルス・ニガー NRRL 3122を、グルコース1%, 硫酸鉄デンプン2%, ノイビーンミール2%,  $3\text{FePO}_4$  0.3%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%を含む生産培養基に接種し37℃で6日間振とう培養した時培養液のpHは6.0程度になり、化合物(I), (II), (III)の生産は最高に達する。また化合物(I), (II), (III)の培養液中での生産濃度は、前述した、培養時の条件によつて異なる事は専門家に於て公知

の事実である。したがって菌株の改良、培養条件の選定によつて単一の化合物のみを生産せしめる事、特定の化合物を合理的に生産せしめる事は専門家にとつて容易な事である。この発明はそれ等のすべての修飾方法をも包括するものである。さらにアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 を上述の如く培養したとき、培養物中に金剛化合物オロボル並びにゲネステイン（何れもインフラボンの一様）を生成していることが認められた！本出願人の同日出願に係る特願第49-

号特願参照。発明の名称「微生物によるオロボールの製造法」。化合物(I), (II), (III)の定量はD.D.C.の吸光度を測定することによつて定数できる。D.D.C.活性阻害はアワバウ等の方法(J. Biol. Chem.; 235, 126, 1960)に従つて測定されるが詳細は下記のとくである。

I - ドーパ  $1 \times 10^{-2}$  モル/l, ビリドキサールリン酸  $7.5 \times 10^{-2}$  モル/l, ドーパデカルボキシラーゼ（この条件下でOD278mμ=0.2を得る酵素量、通常、蛋白質1mg/ml）0.05ml, リ

11

知に基づいて、培養液中の液体部分に存在している、これら化合物はpH 2.0でブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等に抽出される。一方、液体中の化合物(I), (II), (III)は水と混じる有機溶剤、例えば、メタノール、エタノール、アセトン、等で抽出し、蒸発器等によつて蒸発し、これをpH 8.0のアルカリ水に溶解し、不溶部分をのぞいたのち、培養液と同様に溶解液を酸性(pH 2.0)に調整後ブタノール、酢酸ブチル、酢酸エチル等に抽出し、培養液から化合物(I), (II), (III)を抽出した溶剤と混合して濃縮液を得る。

上記の濃縮液を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、クロロフォルム：メタノール50：1の混合溶剤で溶出するとD.D.C.活性を有する5つの分画にわけられる。すなわち、フラクション80~90にウーファクトリグニン〔化合物(IV)〕、フラクション95~98にゲネステイン、フラクション55~75に新化合物(I)、フラクション70~80にオロボルが、最後のフラクション100~120に8-ハイドロキシゲ

13

特開昭50-160483(4)

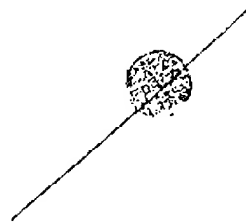
ン酸銀溶液(pH 8.8)0.03モル/l、インプロニアジド(IPRONIAZID)  $1 \times 10^{-2}$  モル/lを合わせ、水で全容1.8mlとする。この混合液を37℃、25分間反応させ、初製するドーパミンを陽イオン交換樹脂アンバライト00-20(ロームアンドハース社製)アンモニウムに吸着させ、水洗後、1%定酢酸で溶出し、紫外部279nmの吸収を測定した。その値より生成ドーパミン量を算出し、収率を求めた。

次に化合物(I), (II), (III)の抽出、精製について記述する。これ等の化合物はアルカリ水、メタノール、エタノールアセトン等に溶けてよく溶解し、ブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等にも溶解する。培養液中のこれら化合物は吸着でブタノール、酢酸ブチル等で抽出される。これら化合物は熱に安定であり、100℃5分間の加熱により、活性は低下しない。又60℃30分間の加熱で、pH 2.0, 7.0, 8.0で安定である。また化合物(I), (II), (III)はpH 2.0で酢酸ブチルに溶解することから、これら化合物は昇酸性物質である。この性

12

ニステイン〔化合物(V)〕が溶出分離される。これらのインフラボン誘導体のそれぞれを蒸発し、メタノールに溶解し、セフアグクx1H-20等により精製する。更にその活性部をシリカゲル(00-7-200~225メッシュ-マリンクロット)等のクロマトグラフィーを利用して、精製できる。化合物(I), (II), (III)は過剰を溶解、例えばベンゼンから新品化される。

次に本発明によつて明らかにされた化合物(I), (II), (III)の理化学的性状、及び生物学的性状について記載する。



26

# A) 化合物(I), (II), (III)の理化学的性質

本実験によつて得られる化合物(I)は、黄褐色の、結晶性であり、262℃で溶融分解する。元素分析の結果の一例はC: 60.43%, H: 3.86%, O: 35.71%で計算及び他の元素は含まれない。マスマスペクトルグラフィーで $m/e=316$ が与えられ、 $C_{16}H_{12}O_4$ の分子式を有する。なお、 $C_{16}H_{12}O_4$ の分子式を有する化合物の元素分析の理論値は、C: 60.76%, H: 3.82%, O: 35.41%である。又、化合物(II)はアルカリ水、メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、ジメチルスルホキシド等によく溶解するが、ベンゼン、クロロホルム、トルエン等には溶けにくい。

紫外線吸収スペクトル曲線では、メタノール溶液中で268 mμ ( $\epsilon \frac{1}{cm} = 960$ ), 295 mμ ( $\epsilon \frac{1}{cm} = 360$ )に吸収極大を有する。又、0.01規定塩酸を含む酸性メタノール溶液中では、288 mμ ( $\epsilon \frac{1}{cm} = 680$ ), 295 mμ ( $\epsilon \frac{1}{cm} = 360$ )に吸収極大を、0.01規定水酸化ナトリウムを含む

15

塩性のプロトンがあり、カップリングをしている。更に、80.30 ppmに芳香族性のプロトンが1個存在する。45.80 ppmにメトキシ基1個が存在する。又、オーバーハウザー効果の測定により、メトキシ基は8位に結合していることが示唆された。

ジメチル硫酸でメチル化を行なうと、4個のメチル基が導入され、テトラメチル体を得られる。このメチル体のメトキシ基に就いて、オーバーハウザー効果を測定するとにより、置換基の位置が6', 4', 8, 7, 9位であることが決定された。又、無水酢酸でアセチル化すると、アセチル基が4個導入され、テトラアセチル体を得ることができた。これにより、フェノール基の水酸基が4個存在することが決定された。更にこのアセチル体を経クロロホルムに溶かし100メガヘルツの核磁気共鳴スペクトルを検討することにより、このアセチル体のB環のプロトンのカップリングの様式が明らかになった。これによりB環の置換様式は1, 2, 4置換様式であることが決定された。

17

特開昭50-160483(5)

むアルカリ性メタノール溶液中では279 mμ ( $\epsilon \frac{1}{cm} = 660$ ), 345 mμ ( $\epsilon \frac{1}{cm} = 420$ )に吸収極大を示す。

臭化カリウムとして紫外線吸収スペクトルを測定すると、波数340, 1680, 1530, 1450, 1380, 1270, 1240, 1100, 1115, 1065, 1035, 995, 910, 865, 830, 780, 750, 680  $cm^{-1}$ に吸収が見られる。

定性反応は、還元第二鉄反応、2,6-ジクロロキノンクロロイミド反応、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン反応は陽性、エールリッヒ反応、ニンヒドリン反応は陰性である。シリカゲルの薄層クロマトグラフィーでは、クロロホルム:メタノール10:1でRf値0.36、酢酸エチル:メタノール20:1でRf値0.70である。

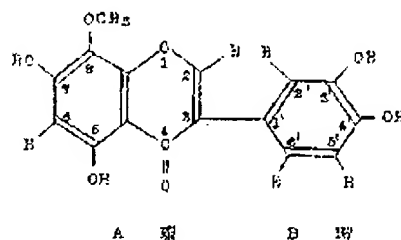
この化合物(III)の100メガヘルツの核磁気共鳴スペクトルに於いて、重アセトン中で8.30付近に水素結合した水酸基の2個のプロトン、8.20にイソフラボン骨格のプロトンが1個、8.7.1τ、6.92 ppmにそれぞれ2個と2個の芳香

16

すなわち、B環の置換基の位置は、1', 3', 4'位であることが決定された。

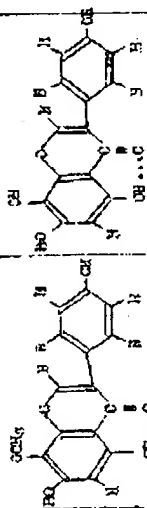
紫外線吸収の極大が臭化アルミニウムの添加により14 mμ 長波長にシフトすることにより、5位に水酸基が、加酸ソーダ添加により2.1 mμ 長波長にシフトすることにより、7位にそれぞれ水酸基が存在することが決定された。

以上の結果により、化合物(III)の構造式を有するとともに、3', 4', 5, 7-テトラハイドロキシ-8-メトキシイソフラボンであると決定した。



化合物(III)の構造は化合物(II)の構造を決定し

18

[illegible]

3) 化合物(I), (II), (III)の生物学的性状

a) 化合物(I), (II), (III)の毒性は85%ジメチルホルムサイト水溶液に溶解して、マウスの腹腔内に投与したときいずれの化合物も250mg/kgで毒性を示さなかつた。

b) 化合物(I), (II), (III)の各種酵素活性に対する阻害活性、(4) D.D.C の阻害活性は前述の方法で測定した時の化合物(I), (II), (III)の50%阻害濃度はそれぞれ表4に示したとおりであつた。

表 4

化合物名	D.D.C 50%阻害濃度
I	3.2 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ( $8.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ )
II	61.0 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ( $1.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
III	2.8 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ( $9.1 \times 10^{-8} \text{ M}$ )

(4) H.D.C の阻害活性は下記に示す方法に示したがつて測定した。すなわちヒ-ヒステジン-2-<sup>14</sup>C ( $1.0 \times 10^5$  cpm) を  $5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、ピリドキサルリン酸  $5.7 \times 10^{-2} \text{ M}$ 、ヒステジンデカル

21

et al; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 174 83-88, 1970) のように測定した時の化合物(I), (II), (III)のCOMTの50%阻害濃度は表5に示したとおりであつた。

表 5

化合物名	COMT 50%阻害濃度
I	6.5 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ( $2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
II	8.8 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ( $1.2 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
III	1.0 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ( $3.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ )

(5) エストラジオールに特異的に結合する子宮頸癌に対する結合阻害活性測定法は、スタンレイの方法 (G.K. Stanley; Journal Clinical Endocrinol and Metabolism 28, 127, 1968) に準じて測定した。エストラジオールが結合するのを50%阻害する化合物(I), (II), (III)の濃度は表6に示したとおりであつた。

25

23

特開 昭50-160483 (7)

メキシラーゼ (50% 1 mg/cc) 0.1 cc、リン酸緩衝液 (PH 6.6) 0.067 M の混合液に 0.1 cc の検定する試料を入れ、脱イオン水で全容を 2.0 cc とし、37°C で 2 時間反応させ、生成したヒスタミン-2-<sup>14</sup>C をアンバーライト CO-80 アンモニア型に吸着させ、水洗後、1 M アンモニア水で、生成ヒスタミンを洗出させ、ブレイのシンチレータを 8 cc 加え、その放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、作図ヒスタミン量を求める。このように測定したときの化合物(I), (II), (III)のH.D.Cの50%阻害活性は表5に示した。

表 5

化合物名	H.D.C 50%阻害濃度
I	5.6 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ( $1.2 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
II	39.0 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ( $1.3 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
III	0.7 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ( $2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ )

(4) COMTの阻害活性はニコデジエビツク等が報告した方法に準じて測定した。(D. Sirodejaovic

22

表 5

化合物名	50%阻害濃度
I	2.1 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ( $6.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
II	2.7 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ( $8.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
III	>20.0 $\mu\text{g}/\text{cc}$ ( $>7.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ )

本発明により新規化合物(I)および化合物(II), (III)が糸状菌の微生物によつて作られることが明らかにされたので、この明細書に記載された知見に基づいて、本明細書に記載された方法を修飾した方法が容易に想到される。修飾阻害剤の生産は特定の菌種に限らない。他の糸状菌を用いてこれを生産することは、専門家にとつて容易なことである。本発明はそのすべての修飾方法を包括し、以下に示す実施例はその例示であつて、本発明は製法に限定されるものではない。

#### 実施例 1

アスペルギルス・ニガー NRRL 3182 株 (農工研菌第 2063 号) をポラトデキストロース斜天斜面培地に 14 日間生育させ、そこから一白金

24



原料を馬鈴薯デンプン 8 ㍑、グルコース 1 ㍑、ソイビーンミール 2 ㍑、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 ㍑、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 ㍑を含む培地 1.5 ㍑を 500 cc 容位の瓶とフラスコに分注し、 $22^\circ\text{C}$ で 20 分間振盪したものに移殖し、 $22^\circ\text{C}$ で毎分 330 回転の振とうで 6 日間培養した。pH は培養前 6.0、1 日後 5.6、2 日後 5.0、3 日後 5.2、4 日後 5.0、6 日後 4.2 であった。

上記 5 日間培養後の培養液は 1 ㍑中 1 ㍑の濃度の化合物印を、化合物印を 0.3 ㍑、グニステアイン 5 ㍑、D-ハイドロキシゲニステアイン 0.06 ㍑を含むしていた。又培養液 10 ㍑より得られる固体に 5 ㍑のメタノールを加えインフラポン装置を有する化合物を抽出した。このメタノール溶液 1 ㍑中には化合物印は 2 ㍑、化合物印は 0.5 ㍑、グニステアインは 5 ㍑、化合物印は 0.06 ㍑含まれていた。この培養液 10 ㍑を蒸過して清澄な溶液 9 ㍑と固体固形物 1.8 ㍑が得られた。培養液は 2 M-塩酸で pH 2.0 とし、4.5 ㍑の酢酸ブチルで 3 回抽出した。固体固形物

25

凝された。このシリカゲルのクロマトグラフィーにより、フラクション 20~30 に化合物印が 2.5~5.5 にグニステアイン、5.5~7.5 に化合物印、7.5~8.0 にオロゲル、8.0~12.0 に化合物印が、それぞれ得られた。それぞれの活性部分をあつめ減圧下に乾燥乾燥した後、それぞれを 5 ㍑のメタノールに溶解し、メタノールで蒸発させたセフアデクサス 1.8~2.0 を充填した 2 ㍑ × 200 ㍑の管に装せ、メタノールにより洗脱し D.D.O 阻害活性分画をあつめ乾燥乾燥した。この乾燥物をさらに精製する目的でそれぞれを 10 ㍑のメタノールに溶解し、それぞれにシリカゲル（マリンクロット社製シリシリック 4R00-7、200~250 ㍑メッシュ）10 ㍑を加えて減圧乾燥乾燥し、これを、クロロホルム：メタノール（100：1）の溶媒系で上記と同じシリカゲル 40 ㍑をゲル化させ 5.5 ㍑ × 30 ㍑の管につめ、その上端に乾燥物をのせ上記の溶媒系でカラムクロマトグラフィーを行くと、それぞれ精製された 1 つのピークとなった。この活性部分を集め減圧

27

抽出 50-160483 (8)  
部は 5.5 のメタノールを加えよく攪拌抽出液にし、4.8 ㍑のメタノール抽出液が得られた。このメタノール抽出液を減圧乾燥乾燥した後、1.2 の水を加え、2 M-NaOH で pH 8.0 とし溶解し不溶部を除く、D.D.O 阻害活性はそのほとんどが可溶部に存在する。この可溶部分を 2 M-HCl で pH 2.0 とし、500 ㍑の酢酸ブチルで 3 回抽出乾燥した。この抽出液と前記培養液より D.D.O 阻害物質を抽出した酢酸ブチルを合せて、減圧乾燥乾燥して、黒褐色の樹脂状物質 2.5 ㍑を得た。このものの D.D.O に対する 50 ㍑阻害は 37 ㍑/㍑であった。この樹脂状物質をメタノール 100 ㍑に溶解し 80 ㍑のシリカゲル（マリンクロット社製シリシリック、4R00-7）を加えて減圧乾燥乾燥し、これをクロロホルム：メタノール（50：1）の溶媒系で上記シリカゲル 80 ㍑をゲル化させ 5.5 ㍑ × 4.5 ㍑のカラムにつめ、その上端に乾燥物をのせ、上記の溶媒系でカラムクロマトグラフィーを行い 20 ㍑の分画で得出すると D.D.O 阻害分画は 5 ㍑の分画で分

26

下で洗脱するとそれぞれの精製物が得られた。これらの精製物をメタノールベンゼンから再精製しそれぞれの精製物が得られた。これらの精製で化合物印が 2.5.8 ㍑、化合物印が 4.8 ㍑、グニステアインが 8.0.5 ㍑、オロゲルが 0.3 ㍑、化合物印が 4 ㍑のそれぞれの精製物が得られた。

#### 実験例 2

ジャーによる培養は、実験例 1 のフラスコ培養の場合と同様な装置を作製し、アスペルギルス・ニガー NRRL3322（農工研第 2003 号）の斜面培養から一白金耳量を接種し、二日間培養したものを接種とする。馬鈴薯デンプン 8 ㍑、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 ㍑、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 ㍑を含む培地 1.5 ㍑を 500 cc 容のジャーに付込み、 $22^\circ\text{C}$ 、30 分間振盪し、これに先きの酵母を 2 ㍑添加し、温度  $22^\circ\text{C}$ 、毎分 250 回転振盪、通気量毎分 10 ㍑で 8 日間培養した。この培養液 1.2 ㍑をバスケット型濾過機で濾過し、2.8 ㍑の清液を得た。実験例 1 と同様酢酸ブチル 5 ㍑で 3 回抽出しこれを減圧乾燥し、1.5 ㍑の樹脂状物質を得た。

28

この抽出率は85%であつた。固体部分にはメタノール0.5を加え、D.D.O 阻害活性物質をメタノールに抽出せしめ、このメタノールを分離し、減圧蒸餾することにより、20gのタール状物質を得た。この活性抽出率は70%であつた。原油及び固体から得たタール状物質をシリカゲル(100-フオースペシャル-マリンクロツト)500gを充填したクロマト管で分離、精製し、D.D.O 阻害活性を有する5つの分画を得る。実験例1と同様にそれぞれをセフアデククスLH-25、100gのクロマトグラフィーで精製し、さらにシリカゲル(マリンクロツト社製シリシリツタA R 000-7 200~325メツシニ)500gを充填したクロマト管をもちいクロマトグラフィーを行ない精製し、メタノールベンゼンから結晶化させた。この場合は20.8gの化合物(I)、7.8gの化合物(II)、11.5gのゲネステエイン、0.2gのオロボル、5.2gの化合物(III)の結晶を得た。

#### 実験例 3

タンクによる培養は実験例1と同様にして培養

した酵母を第1次酵母とし、実験例1と同様にして培養した酵母を第2次酵母として、200g容のステンレススチール製タンクに実験例1と同様の培養を150g仕込み、シリコン樹脂を0.01g加え12gで、30分間浸し、これに第2次酵母を5g接種し毎分200回転で撹拌し、2リットルで5日間培養した。この培養液をフィルタープレスで処理し220gの培養液と固体21gを得た。培養液は実験例1及び2と同様に減圧でpH 2.0となし酢酸ブチル0.5で5分間振盪中に含まれているD.D.O 阻害物質を抽出した。又固体固形部分に含まれるD.D.O 阻害物質の抽出は60gのメタノールを加え、かく拌、抽出、処理し、メタノール抽出液53gを得た。このメタノール溶液を減圧、蒸餾、乾固し、一酸化水酸化ナトリウムを加えつつ20gの水(pH 8.0)に溶解した。この溶液に酢酸を加え、pH 6.0となし、酢酸エチル6gで5分間抽出した。この酢酸ブチル抽出液は、培養液より抽出した酢酸ブチルとあわせ減圧蒸餾乾固し以後実験例1と同様の

状態で同様に精製し以下の量のインフラボン誘導体の結晶を得た。即ち化合物(I)を180mg、化合物(II)を10.2mg、ゲネステエインを100mg、オロボルを40.8mg、および化合物(III)を43.5mg、各々の結晶として得た。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は化合物(I)の純メタノール溶液(曲線a)、0.02%規定塩酸を含む90%メタノール溶液(曲線b)、及び0.01%規定水酸化ナトリウムを含む90%メタノール溶液(曲線c)中の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

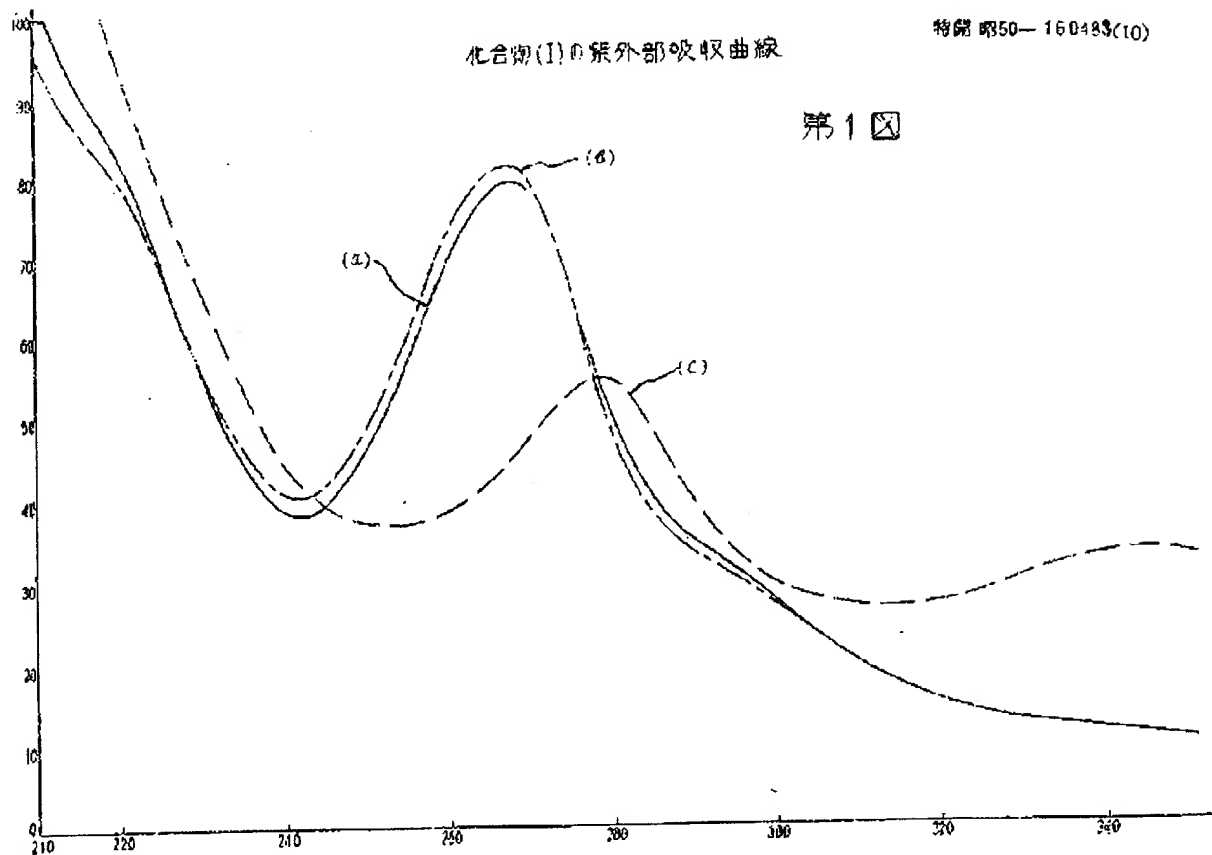
第2図は第1図と同様な溶液中での化合物(II)の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

第3図は第1図と全く同様な溶液中での化合物(III)の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

第4図、第5図、第6図はそれぞれを臭化カリウム溶液中で測定した時の化合物(I)、II、IIIの紫外線吸収スペクトル曲線を示したものである。

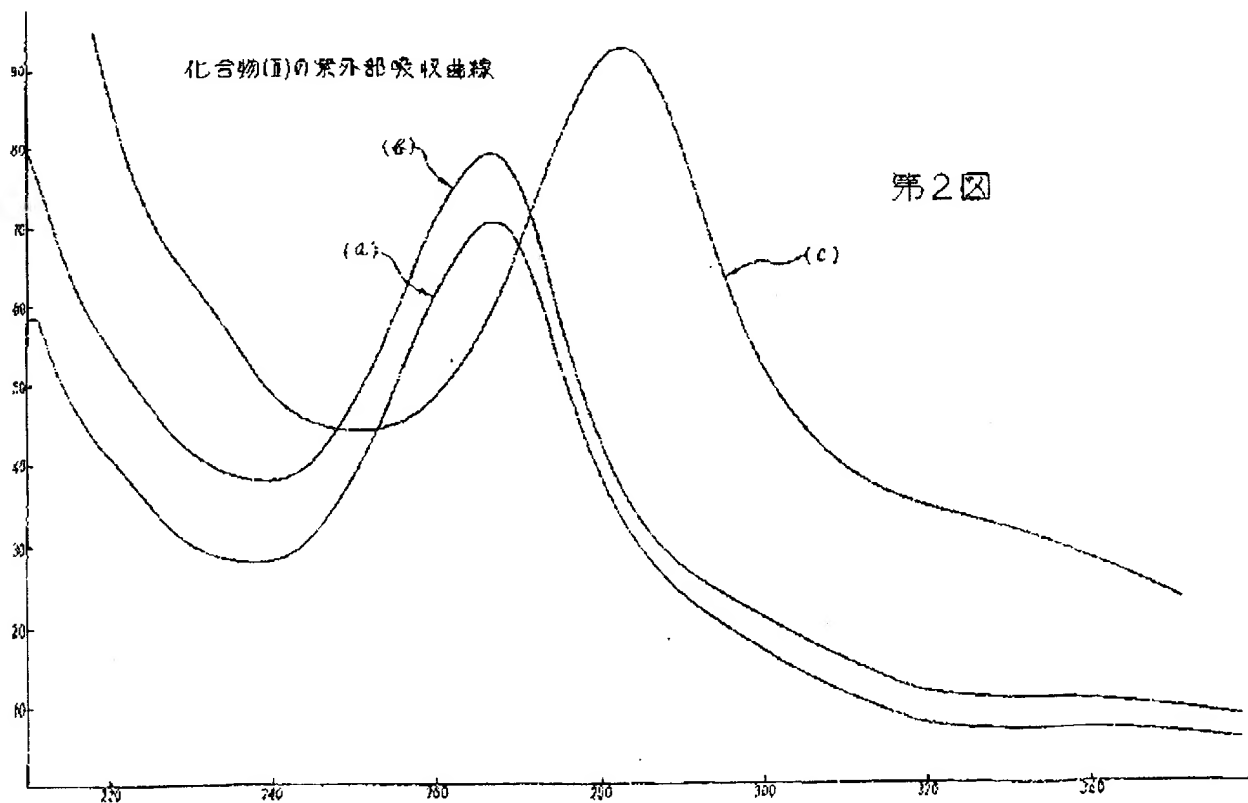
化合物(I)の紫外吸収曲線

第1図

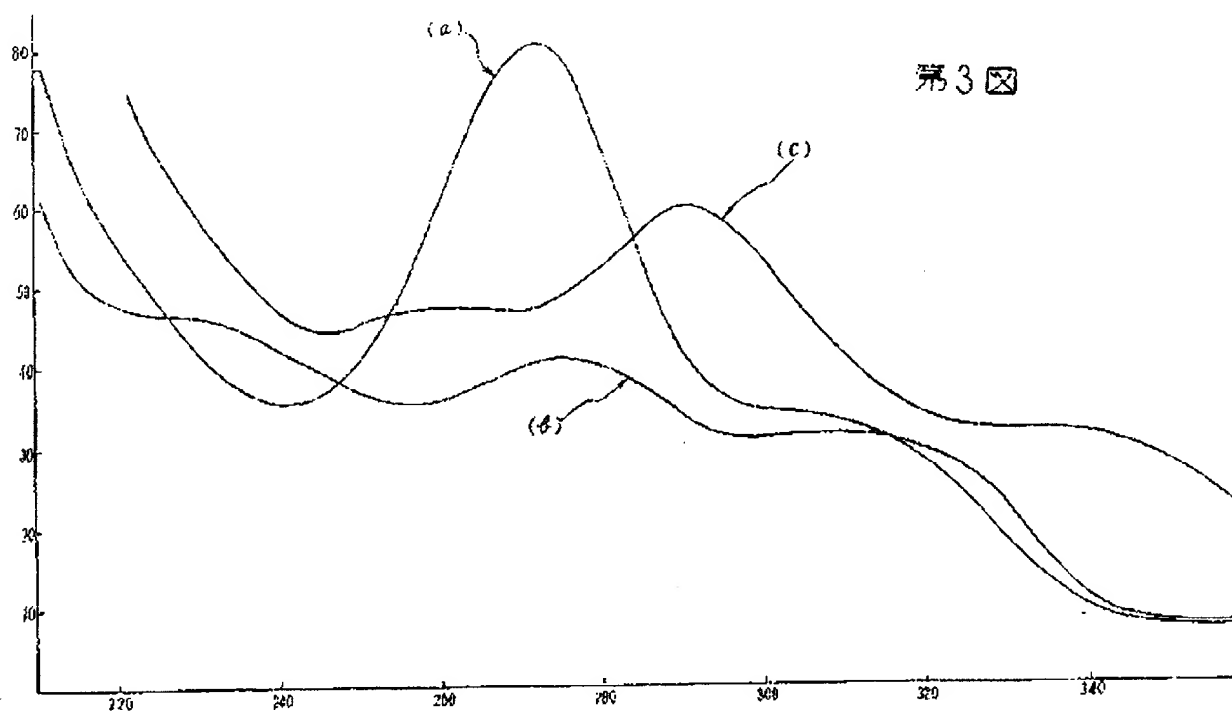


化合物(II)の紫外吸収曲線

第2図

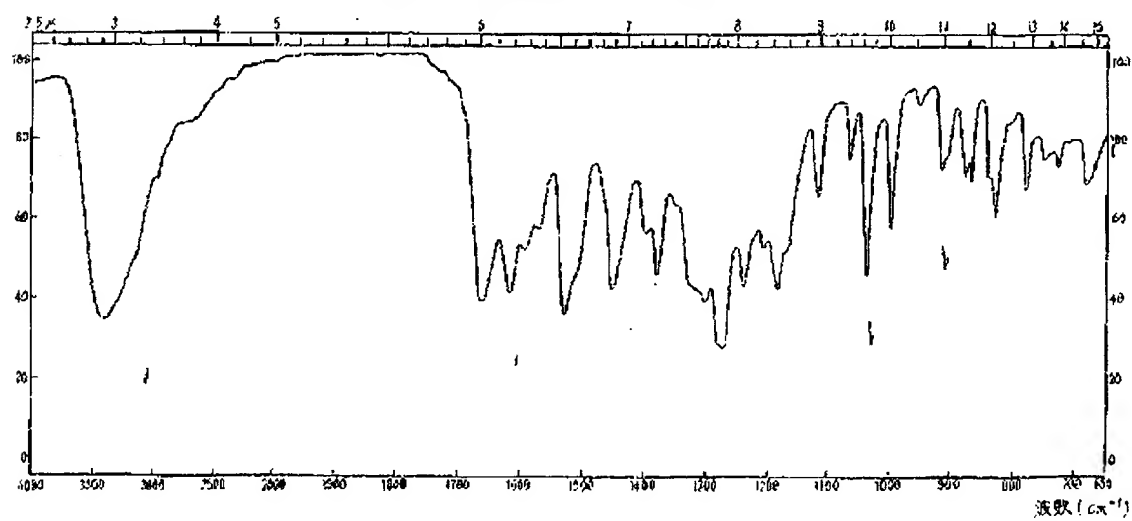


化合物(Ⅲ)の紫外吸収スペクトル曲線



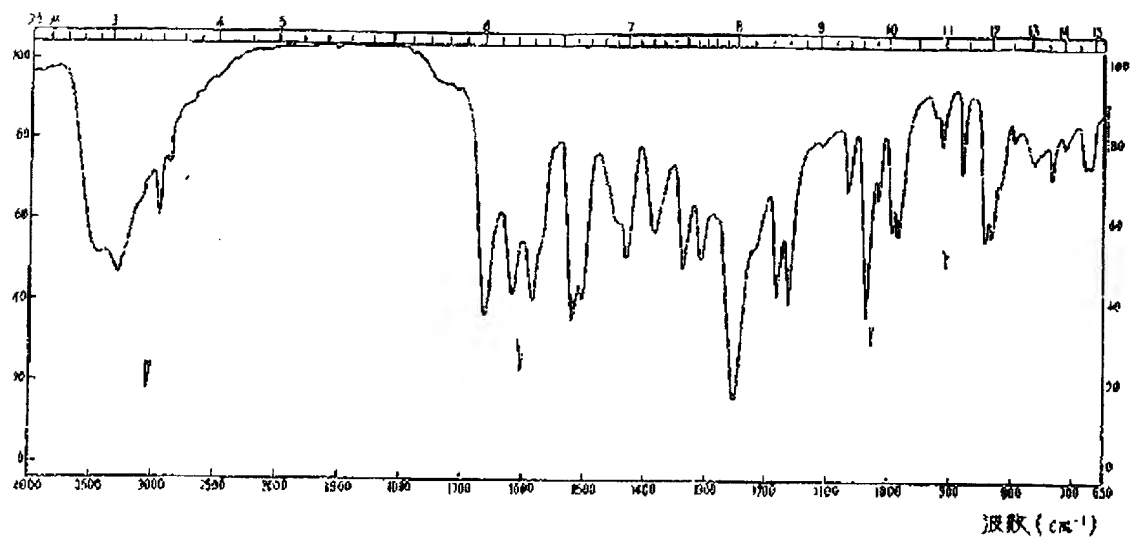
第4図

化合物(Ⅰ)の赤外吸収スペクトル曲線



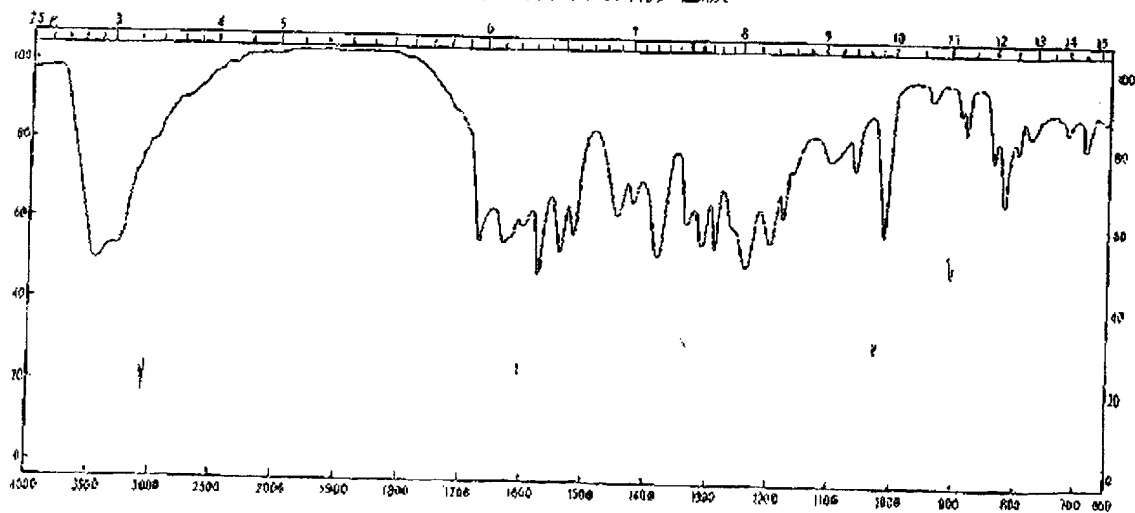
第5図

化合物(II)の赤外吸収スペクトル曲線



第6図

化合物(III)の赤外吸収スペクトル曲線



6. 添附書類の目録

- |                |    |
|----------------|----|
| (1) 明細書        | 1通 |
| (2) 図面         | 1通 |
| (3) 委任状        | 1通 |
| (4) 新書副本       | 1通 |
| (5) 微生物受託番号通知書 | 1通 |

7. 前記以外の発明者、代理人

(1) 発明者

住所 東京都品川区東五反田5丁目1番11号  
ニューフジマンション701-A

氏名 竹内 吉雄

住所 東京都世田谷区東玉川町2丁目12番地

氏名 声 福 広 敏

(2) 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号  
三井物産ビル

氏名 朝 内 忠 夫

同所 八 木 田 茂

同所 浜 野 孝 雄

同所 森 田 智 二

特開 昭50-160483(13)  
手続補正書 (自発)

昭和 49 年 10 月 3 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和 49 年 特 許 願 第 69119 号

2. 発明の名称 生理活性を有するインフラゴン  
化合物の微生物による製造法

3. 補正をする者

発明者の関係

特許出願人

住所 東京都品川区上大崎3丁目1番23号

氏名 財団法人微生物化学研究会

4. 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号、三井物産ビル内

(2400) 氏名 金 丸 義 男

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

A. 補正の内容

- (1) 明細書第1頁第6行の「パー・キンソン」を「パーキンソン」と訂正する。
- (2) 同第4頁第4行の「Wilson」を「Wilson」と訂正する。
- (3) 同第7頁第8行の「パーキンソン」を「パーキンソン」と訂正する。
- (4) 同第10頁第9行の「。」を削除する。
- (5) 同第11頁第10行の「キター」の次に「69/10」を加入する。
- (6) 同第11頁第4行（下から）の「エーダーバ」の前に「総漢字で」を加入し、「セル／ム」を「ム」と訂正する。
- (7) 同第11頁第3行（下から）の「セル／ム」を「ム」と訂正する。
- (8) 同第12頁第1行の「セル／ム」を「ム」、  
「イソブ」を「イブ」とそれぞれ訂正する。
- (9) 同第12頁第2～3行の「セル／ム」を

「むせ、」を削除し「4の値を0.5に決定する試料の、0.5を加え」を加入する。

(10) 同第12頁第5行の「アンバライト」を「アンバライト」と訂正する。

(11) 同第12頁第12行の「エタノール」の次に「。」を加入する。

(12) 同第12頁第13行の「エチル」を「エチル」と訂正する。

(13) 同第12頁第14行の「ブチル」を「ブチル」、  
「エチル」を「エチ」とそれぞれ訂正する。

(14) 同第12頁第15行の「クロマト」を「マリンクロマト」を訂正する。

(15) 同第12頁第16～17行の「マリンクロマト」を削除する。

(16) 同第12頁第18行の「マスマスベクトルグラフ」を「マスマスベクトロメトリー」と訂正する。

(17) 同第12頁第19行の「340」を「3400」と訂正する。

(18) 同第12頁第20行の「分子式」を「分子重量及び分子式」、  
「300」を「300, C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>」,

「286」を「286, 013 010 0。」と補正する。

119 同第2の図解1の第8行、第9行、第10行の各「nn」をいずれも「nn」と訂正する。

120 同第2の図解2の「ExDerimental」を「ExDerimental」と訂正する。

121 同第2の図解3の「ブチール」を「ブカル」と訂正する。

122 同第2の図解4の「シリシリツク。ブドCC-7」を「シリツク&BCC-7。」と補正する。

123 同第2の図解5の「外質」を「物質」、「5ヶ」を「5個」と訂正する。

124 同第2の図解6の「シリシリツク」を「シリツク」と訂正する。

125 同第2の図解7の「メタノール」の次に「・」を加入する。

126 同第2の図解8の「286、」の次に「グルコースノ2、ソイビーンミール286、」を加入する。

127 同第2の図解9の「き」を削除する。

128 同第2の図解10の「し、」の次に「固体抗凝剤を混ぜて」を加入する。

129 同第2の図解11の「CC-7をスペシャルーマリンドロフト」を「マリンドロフトはシリツク&BCC-7、スペシャル」と補正する。

130 同第2の図解12の「シリシリツク」を「シリツク」と訂正し、「-7」の次に「・」を加入する。

131 同第2の図解13の「メタノール」の次に「・」を加入する。